

【物件名】

資料 5

【添付書類】

19  111

資料5

(19) 日本特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-84075

(48) 公開日 平成5年(1993)4月6日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> C12N 9/10 A61H 5/00 C07K 15/10	識別記号 A ZNA	庁内整理番号 7823-4B 8606-2B 7731-4H 7236-4B 8628-4B	FI  C12N 5/00 15/00	C A	技術表示箇所
審査請求 未請求 請求項の数(全19頁) 最終頁に続く					
(31) 出願番号	特願平3-353331				
(32) 出願日	平成3年(1991)11月13日				
(33) 優先権主張番号	613186				
(34) 優先日	1990年11月14日				
(35) 優先権主張国	米国 (US)				
(71) 出願人	591116001 フィリップ・モーリス・プロダクト・イン コーポレイテッド PHILIP MORRIS PRODU CTS INCORPORATED アメリカ合衆国バージニア州22204、リ ッチモンド、コマース、ロード 2801 (72) 発明者 ハーバート・ワイ・ナカニ アメリカ合衆国バージニア州23112、ミ クロシアン、バーンズ、スプリングス、ロ ード 13815 (74) 代理人 弁理士 安達 光雄 (外1名)				
最終頁に続く					

(54) 【発明の名称】 プトレツシンN-メチルトランスフェラーゼ、プトレツシンN-メチルトランスフェラーゼをコードする組換えDNA分子、およびニコチン含量が増化したトランスジェニックタバコ植物

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 この発明は、高度に精製されたタバコプトレツシンN-メチルトランスフェラーゼ (PMT)、その精製法、およびPMT DNA配列の製造法を提供するものである。

【構成】 精製法は、タバコ植物抽出液をアニオン交換樹脂に添加する工程を有し、添加温度および抽出液のpHと組成は、PMTがアニオン交換媒体によって保持されるような条件である。次にPMTを、有効量のポリアミンを含む蔗糖緩衝液で、アニオン交換媒体から洗脱する。またPMTをコードするセンズ組換えDNA分子とアンチセンス組換えDNA分子、これらの組換えDNA分子を含むベクター、およびこれらのDNA分子またはベクターで形質転換されたトランスジェニックタバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物を提供するものである。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 S-アデノシルメチオニンのメチル基を、ブトレッシンのS-アミノ基へ転移させる反応を触媒する性能を特徴とし、その他のタバコタンパク質を実質的に含有していないタバコタンパク質。

【請求項2】 さらに、(a) 分子量が50～85キロダルトン、(b) 未反応等電点がpH5.0～8.0、(c) ブトレッシンについてのK<sub>m</sub>が300～500μM、および(d) S-アデノシルメチオニンについてのK<sub>m</sub>が100～150μMであることを特徴とする請求項1記載のタバコタンパク質。

【請求項3】 配列番号1、配列番号2、または配列番号3で定義されるアミノ酸配列を含有する請求項2記載のタバコタンパク質。

【請求項4】 (a) ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼがアニオン交換媒体に保持されるような、添加剤およびタバコ抽出液のpHと化学組成で、タバコ抽出液をアニオン交換媒体に加え、ならびに(b) ポリアミンを含有してなければ、ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼがアニオン交換媒体に保持されるような、溶媒濃度および特異性阻害剤のpHおよび化学組成で、有効量のポリアミンを含有する溶媒濃度で、ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼをアニオン交換媒体から分離することと特徴とする。ブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼをタバコ細胞抽出液から精製する方法。

【請求項5】 ポリアミンが、ブトレッシン、N-メチルブトレッシン、スペルミン、スペルミジン、アグマチン、カバペリンまたはその混合物である請求項4記載の方法。

【請求項6】 アニオン交換媒体が、ジエチルアミノエチル、ポリエチレニミド、第三級アミノ、第四級アミノ、コアミノベンジルおよびヒメチル(2-ヒドロキシロピリル)アミノエチルから選択される一つ以上の無機成分をもっている請求項4または5に記載の方法。

【請求項7】 無機成分がジエチルアミノエチルで、アニオン交換媒体が好ましくはジエチルアミノエチルアガロースである請求項4記載の方法。

【請求項8】 (a) 添加剤が2～10℃で好ましくは4～8℃であり、(b) 抽出液のpHが7.2～8.3で好ましくは約7.5であり、および(c) 抽出液が、(i) 有効量の塩化リット、(ii) 有効量の還元剤、(iii) 有効量の有効量の還元剤および(iv) 有効量の重金属キレート剤を、含有している請求項4記載の方法。

【請求項9】 (a) 溶媒濃度が18～28℃、(b) 溶媒濃度のpHが7.2～8.3で好ましくは約7.5であり、(c) さらに溶媒濃度が、(i) 有効量の還元剤、(ii) 有効量の還元剤、(iii) 有効量の還元剤および(iv) 有効量の重金属キレート剤を、含有している請求項4記載の方法。

(2)

特開平5-84075

2

【請求項10】 (i) 約10mMのトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、(ii) 約2mMのイソトレイール、(iii) 約20% (V/V) のグリセリンおよび(iv) 約1mMのエチレンジアミン四硫酸を、抽出液が含有する請求項8記載の方法。または上記4成分を溶媒濃度が含有する請求項9記載の方法。

【請求項11】 ポリアミンがブトレッシンであり、溶媒濃度が0.5～5mMの量で存在している請求項8または10に記載の方法。

【請求項12】 ブトレッシンが、溶媒濃度中約5mMの量で存在している請求項11記載の方法。

【請求項13】 アニオン交換媒体が溶媒濃度の存在下でブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼに対して無活性を有するクロマトグラフィ媒体に、抽出液を直接添加し、次いで結合した物質をクロマトグラフィ媒体から溶媒することによってアニオン交換抽出を継続する工程をさらに有する請求項4記載の方法。

【請求項14】 前記クロマトグラフィ媒体がω-アミノヘキシルアガロースである請求項13記載の方法。

【請求項15】 請求項1、2または3に記載のタバコタンパク質をコードする組換えDNA分子。

【請求項16】 さらに、作動可能な連結された調節配列を含有し、タバコタンパク質をコードする配列がアンチセンス組換えDNA分子。

【請求項17】 請求項16の組換えDNA分子をコードするmRNAと組換え形成するDNAをコードするアンチセンス組換えDNA分子。

【請求項18】 請求項16のセンス組換えDNA分子を含有するベクター。

【請求項19】 請求項17のアンチセンス組換えDNA分子を含有するベクター。

【請求項20】 請求項15、16または17の組換えDNA分子で安定に形質転換された培養トランスジェニックタバコ細胞。

【請求項21】 請求項18または19のベクターで安定に形質転換された培養トランスジェニックタバコ細胞。

【請求項22】 未形質転換の対照タバコ植物よりニコチン含量が高いことを特徴とする。請求項15もしくは16記載の組換えDNA分子または請求項18記載のベクターで安定に形質転換されたトランスジェニックタバコ植物。

【請求項23】 未形質転換の対照タバコ植物よりニコチン含量が高いことを特徴とする。請求項15もしくは17記載の組換えDNA分子または請求項19記載のベクターで安定に形質転換されたトランスジェニックタバコ植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】この発明は、高度に精製されたブトレッシンN-メチルトランスフェラーゼ、その発酵の精製方

50

(3)

特開平5-84075

法、およびそのアンチセンス遺伝子およびセンス遺伝子に関する。特にこの発明は、ニコチンレベルを遺伝的に変化させるとトランスジェニックタバコ植物を創製するためのセンスおよびアンチセンスのプロトシスN-メチルトランスフェラーゼ遺伝子の使用に関する。このようなトランスジェニック植物は、タバコ産業に用いる乾燥タバコ葉を製造するのに有用である。

【0002】タバコからニコチンを除くために各種の方法が採用されている。しかしこれらの方法のほとんどが、ニコチンに対して充分に選択的でない。これらの方法はタバコから他の成分を除去するのでタバコの風味と香気に不利な影響を与える。その上に、このような方法は、一般に複雑で費用が高い。

【0003】ニコチンと生化学的に合成される化合物は、一般に一連の生化学反応によって形成され、各反応は異なる酵素によって触媒される。所定の化合物をもたらす特定の反応系列が一つの経路として知られている。経路の末端とその最終生成物の産生を阻害する1方法は、その経路に必要な酵素を減少することである。経路の他の酵素に比べてその酵素の活性が、通常、経路の作用におけるその酵素を律速的にするよう充分に低い場合、酵素のその活性が減少すると、最終生成物の産生量が低くなる。酵素の相対的活性が、通常、律速的でない場合は、細胞中のその活性は、経路の産生量を減少させるためには、酵素を律速的にするよう充分に低下させなければならない。同様に酵素の相対的な活性が律速的である場合、その活性の増大によってその経路の最終生成物の産生量が増大する。

【0004】ニコチンは最初にタバコ植物の根で形成され、次に葉に輸送され、葉で貯蔵される (Tao, *Physiology and Biochemistry of Tobacco Plants*, 233~234頁, Darden Hutchinson & Ross, 米国, ペンシルヴェニア州, ストラウスズバーク, 1978年)。ニコチン分子は、二つの要素、ピリジン部分およびピロリジン部分で構成され、その各々は別個の生化学経路から誘導される。ニコチンのピリジン部分はニコチン酸から誘導される。ニコチンのピロリジン部分は、プロトシスからN-メチルトレッシンに、次いでN-メチルトレッシンに至る経路によって提供される。ニコチン生合成の必須の工程は、プロトシスからN-メチルトレッシンを生産する工程である (Goodwin and Mercer, *Introduction to Plant Biochemistry*, 488~491頁, Pergamon Press, 米国, ニューヨーク, 1983年)。

【0005】プロトシスのN-メチルトレッシンへの酸化反応は、メチル転移基としてS-アデノシルメチルを用いて行われ、酵素であるプロトシスN-メチルトランスフェラーゼ ("PMT") によって触媒される。PMTは、タバコ内のニコチン合成用のN-メチルトレッシンを供給する経路で律速酵素のようである

(Feitelson, "Regulation in Tobacco Callus of Enzyme Activities of the Nicotine Pathway", *Planta*, 188巻, 402~407頁, 1986年; Wagner等, "The Regulation of Enzyme Activities of the Nicotine Pathway in Tobacco", *Physiol. Plant*, 88巻, 687~697頁, 1986年)。

【0006】比較的に粗製のPMT製剤 (80倍の精製度) について限定的な特性決定がなされている (Nizuka et al., "Phytochemical Studies on Tobacco Alkaloids XIV. The Occurrence and Properties of Putrescine N-Methyltransferase in Tobacco Plants", *Plant Cell Physiol.*, 12巻, 633~640頁, 1971年)。その製剤に至る精製工程は、最初の抽出液からの核酸アンモニウム沈降法とゲル浸透クロマトグラフィに拠っていた。

【0007】植物によって通常得られるよりも有意に低いレベルの酵素 (またはその他のタンパク質) を特徴とする植物を、アンチセンスRNA法によって作ることができる。通常、標的酵素をコードする遺伝子の転写を、その一本鎖mRNAが生成し、そのRNAは次にリボソームによって翻訳されて標的酵素が得られる。アンチセンスRNA分子は、そのヌクレオチド配列が標的mRNA分子のある部分に対して相補的なRNA分子である。したがってアンチセンスRNA分子は、標的mRNA分子と相補的な塩基対合を行い (塩基形成)、その標的mRNA分子を阻害的に利用できないようにして一層分解し、または両方を行う。したがって、標的mRNAがコードする特定の酵素を生産する細胞の機能が阻害される。

【0008】アンチセンス法は、いくつもの研究で採用され、特異的な酵素が通常の量より低いことを特徴とするトランスジェニック植物が創製されている。例えば、低レベルのカルコンシンターゼ (花の色素の生合成経路の酵素) を含有する植物が、カルコンシンターゼのアンチセンス遺伝子をタバコとベトナムのノムに挿入することによって生産されている。これらのトランスジェニックタバコ植物とトランスジェニックベトナム植物は、通常の紫色よりうすい色の花を生産する (Van der Krol等, "An Anti-Sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation", *Nature*, 333巻, 866~868頁, 1988年)。またアンチセンスRNA法は、トマト製に、ポリガラクトワロナーゼ酵素が産生するのを阻害するために採用して成功しており (Seith等, "Antisense RNA Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomatoes", *Nature*, 334巻, 724~728頁, 1988年; Shady等, "Reduction of Polygalacturonase Activity in Tomato Fruit by Antisense RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85巻, 8805~8809頁, 1988年)、およびタバコ、リボ

(9)

特開平5-84075

ースビスリン酸カルギンシラーゼ酵素の小さなサブユニットを産生するのを阻害するに成功している (Roden et al., "Nuclear-organellar Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose Biphosphate Carboxylase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants", *Cell*, 55巻, 873~881頁, 1988

年)。あるいは、所定の酵素の過剰量より多いことを特徴とするトランスジェニック植物を、センス (すなわち高濃度) の配向のその酵素の遺伝子で植物を形質転換することによって創製することができる。

[0009] PMTのレベルを変化させることによつて、タバコ植物のニコチンレベルを上下させるタバコ植物の遺伝子工学はまだ可能になっていない。その理由は、PMT酵素を予め精製することなしにPMT遺伝子をクローニングする方法が知られておらず、またPMT酵素の精製法はこの発明以前に知られていなかったからである。

[0010] この発明は、第1に、高度に精製されたプトレンシアン-メチルトランスフェラーゼ ("PMT") と、その酵素の新規な精製法を提供するものである。

[0011] この発明の精製法は、タバコ植物抽出液をアニオン交換媒体に添加する工程を有し、添加量および抽出液のpHと組成は、PMTがアニオン交換媒体によって保持されるような条件である。次にPMTを、有効量のポリアミンを含む溶剤溶液中で、アニオン交換媒体から洗脱する。また洗脱温度および洗脱液組成のpHと化学組成は、ポリアミンがなければ、PMTがアニオン交換媒体によって保持されるような条件である。

[0012] 好ましい態様において、アニオン交換媒体の前抽出液を、アニオン交換媒体の溶離機液の存在下、PMTに対して親和性を有するクロマトグラフィ媒体に直接添加し、次に、結合された物質を洗脱する。最も好ましくは、アニオン交換カラムからの出口が $\alpha$ -アミノヘキシルアクリレートカラムの入口に接続され、後者のカラムにアニオン交換カラムからの希薄PMTが流れ、次に、次により洗脱された形態でPMTが抽出される。

[0013] この発明のPMTは、分子量が約55~65キログラム、未変性の等電点約5.0~6.0のpH、プトレンシアンについてのKm値が約300  $\mu$ M~500  $\mu$ M、およびS-アデノシルメチオニンについてのKm値が約100  $\mu$ M~150  $\mu$ Mである。好ましい態様では、PMTは、配列表に配列番号1、配列番号2および配列番号3として規定されているアミノ酸配列から選択される17のアミノ酸の配列をもっている。

[0014] またこの発明は、プトレンシアン-メチルトランスフェラーゼをコードするセンス転換DNA分子とアンチセンス転換DNA分子、これらの転換DNA分子を含有するベクター、およびこれらのDNA分子またはベクターで形質転換されたトランスジェニック

タバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物を提供するものである。この発明のトランスジェニックタバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物は、未形質転換の親元のタバコ細胞とタバコ植物よりニコチン含量が低い、または高いことを特徴としている。

[0015] PMTの精製 PMT精製に用いる出発物質はタバコの根で精製されている。その根は水耕栽培されたタバコ植物から収穫することが好ましい。水耕栽培法は、高度に制御された環境性のある条件下で植物を成長させることが容易であり、均等で無菌の状態、広がった糸状根系を効率よく収穫することができる。

[0016] タバコの種子は、滅菌した植物媒体混合物の表面もしくはその近傍で発芽させることができる。最も好ましい条件は約80°Fの温度と80%の相対湿度である。種子が発芽してから約2週間後、実生苗を間引きし (除去し)、残留実生苗の高さが約6インチで約6枚の葉が生成する時期まで、培養されず成長するのに充分な余白を添す。実生苗が、約6インチの高さに到達したとき、一般に、根糸と根生植物のトレットはそのままで、適切な養分溶液が入れられ、この養分溶液の酸化 (還元) 手段を備えた水耕装置に移植される。またこの水耕栽培装置は、培養された実生苗を補充するように設置されていなければならない。かつ充分に成長したタバコ植物を収穫するのに充分な大きさでなければならない。

[0017] 根状根の除去 (摘花) は商業的タバコ栽培における標準の慣行であるが、根の成長を増進して葉のニコチン含量を増大することは、当該技術分野では公知である。それ故に、PMTの精製用の出発物質として使用される植物は、通常、成長の適当な段階で摘花される。根付けと摘花の適切な間隔は、とりわけ、植物の品種、光の強度、日長、土壌と空気の種類、土壌水分および根根栄養を含むいくつもの因子によって定まる。しかし、一般に根は摘花してから3~7日後に収穫される。所定の組合せの生育条件下で栽培される所定のタバコ品種の摘花の最速時期は、当該技術分野の熟練者ならば容易に決定することができる。

[0018] 収穫された根は冷水で洗浄することが好ましく、次に洗滌液をブレンダーで吸引して除去する。次に洗滌した根は、収穫して直ちに、使用されるかまたは-80°Fにて貯蔵される。凍結された根は、使用するまで約-80°Fにて貯蔵される。

[0019] 一般的にPMT精製法では、抽出液を1:1当り約400~600gの凍結根組織を高速混合器でホモジナイズする。抽出液は、一般に、一つ以上の緩衝液、一つ以上の還元剤、一つ以上の金属キレート剤、一つ以上の水溶性性質性、および一つ以上のプロテアーゼ阻害剤とそれらの有効量を含有している。また抽出液は、一つ以上のアミノ酸系化合物緩衝液の

50

7

有効性を含有している方が好ましい。これらの薬剤の有効性は、使用される特定の薬剤によって決まる。しかし使用量は、一般に、植物タンパク質の精製中に使用される一般的な量から選択される。したがって、薬剤とその有効量の選択は、通常の研究者の技能の範囲内にある。

【0020】抽出液調液のpHは、約7、2～8、3の範囲にあれば好ましいが、好ましくは約7、5である。所望のpHで有効なpH緩衝液を与える緩衝液（pH）を有する水溶性化合物が使用される。また好ましい緩衝液は陰イオンを事実上遮断する。適切な緩衝液には、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（“Tris”）、イミダゾール、リン酸塩、N-モルホリノプロパンスルホン酸（“MOPS”）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-2-アミノエタンスルホン酸（“TES”）、トリエタノールアミン、およびN-トリス（ヒドロキシメチル）-2-メチルグリシン（“Tricine”）が含まれる。トリス緩衝液が好ましい。

【0021】タンパク質のスルフィド基の起りうる酸化反応と、植物のフェノール化合物の起りうる酸化反応とを阻害して反応性過酸化ジカルの生成を阻害するために、還元剤を抽出液調液中に添加する。これら両方の反応はPMTを不活性化することがある。適切な還元剤には、ジチオトレイトール（“DTT”）、ジチオエリトリール、2-メルカプトエタノール、チオグリコール酸、グルタチオン、システイン、およびアスコルビン酸が含まれる。DTTとアスコルビン酸が好ましい。

【0022】重金金属キレート化剤は、プロテアーゼ類の活性化、および重金金属との直接相互作用によるまたはフェノール化合物を酸化してPMTを不活性化させる際に生じる反応の重金金属による促進によって起りうるPMTの不活性化を防止するために、抽出液調液に添加される。好ましい重金金属キレート化剤としては、エチレンジアミン四酢酸（“EDTA”）があるが、他の通常のキレート化剤例えばエチレンジアミン四酢酸（8-アミノエチルエタノール、N、N、N、N’-四酢酸（“EGTA”）およびクエン酸も使用することができ。

【0023】水溶性陰イオンは、PMTを不活性化させる、起りうる活性とその他の少量の促進剤の酸化に対してPMTを安定化するために、抽出液調液に添加される。このような水溶性陰イオンは、非イオン性の糖水性化合物であり、これらが添加される水溶液の水活性を低下させる。グリセリン、エチレンジアミン四酢酸および低分子量のポリエチレングリコール（例えば“PEG400”）が好ましいが、グルコース、スクロース、フルクトースおよびソルビトールが、水溶性陰イオンとして有用な他の化合物の例である。

【0024】プロテアーゼ阻害剤は、組織を均質化中に放出されるタンパク質分解酵素によるタンパク質切断によるPMTの起りうる不活性化を防止するために、一般

(5)

特開平5-84075

8

に抽出液調液に添加される。有用なプロテアーゼ阻害剤には、フェニルメチルサルホニルフルオリド（“PMSF”）、ロイペプチン、アプロチニン、キモスタチンおよびペプスタチンが含まれている。PMSFとロイペプチンが好ましい。

【0025】フェノール系化合物の吸着剤は、存在している、植物組織が破壊されると酸化されて、PMTを不活性化もしくは沈降させるフェノール系植物化合物を除くために、抽出液調液に添加することが好ましい。一般に、フェノール系化合物を吸着するために、不溶性のポリビニルピロリドン（“PVPP”）とアンバーライトXAD-4を抽出液調液中に懸濁させる。PMT酵素の活性に対して有害な毒を考えると、フェノール系化合物を除去するまたは不活性化する他の物質には、PVPPもしくはアンバーライトXAD-4とこれらのものの代わりになるものがある。

【0026】糖鎖を添加する前に、抽出液調液は約-15℃～-20℃に冷却され、凍結スラリーを生成させる。均一化の工程で、ホモジナイザーの温度は約3～5℃以上上昇させてはならない。

【0027】当該試料分析の通常の熟練者には分かっているように、上記の方法に用いられる組織の量は変えることができるが、使用される組織のおよその重量は測定しなければならず、それに応じて、使用される他の成分の量が調整される。

【0028】均一化処理の後、不溶性物質（破砕されたフェノール化合物を含有するPVPPを含む）は、ホモジナイザーから除去するのが好ましい。この除去は、好ましくは約10000～20000×gに設定された冷凍遠心機で、約4℃で約30～60分間沈降させることにより行われる。不溶性物質を沈降させた後、可溶性抽出液（すなわち上澄み液）をデkantする。可溶性抽出液の最終のタンパク質濃度は一般に約2、5～3、5 mg/g/mlである。

【0029】可溶性抽出液を緩衝アンモニウムで分離し、標準の方法（Scopes, Protein Purification Principles and Practice, 48～52頁, Springer-Verlag, 米国, ニューヨーク, 1982年）にしたがって、40%～65%濃度アンモニウムの調液（沈降）を、可溶性抽出液から求める。次にその調液を、重量1g当たり約0、1～0、4 mlの塩析緩衝液に溶解する。

【0030】40%～65%濃度アンモニウムの調液を溶解するのに好ましい緩衝液は、有効量の、緩衝液、重金金属キレート化剤、還元剤、水溶性陰イオンおよびプロテアーゼ阻害剤を含有している。最も好ましい緩衝液調液は、トリス緩衝液（pHが約7、5）（約10～20 mM）、EDTA（約1～10 mM）、グリセリン（約10～30%）、DTT（約1～10 mM）、PMSF（約0、2～10、0 mg/ml）、およびロイペプチン（約0、2～10、0 mg/ml）を含有している。これ

30

9

らの酸成分は、抽出液中の酸成分に対する上記の目的のために含有させてある。当該技術分野の熟練者は、これらの成分は酸の機能を有する他のもので取換えることができることを知っているであろう。

[0031] 前記の調整アンモニウム成分を、次いで標準の方法、例えば透析もしくはふるいクロマトグラフィーで脱塩し、次いで調整された成分を、下記のようにしてアニオン交換クロマトグラフィーに装填かける。しかし好ましい態様では、調整アンモニウム成分は最初、疎水性相互作用クロマトグラフィーにかかる。

[0032] 溶解された調整アンモニウム成分を疎水性相互作用クロマトグラフィーにかかる前に、塩を加加して、PMTが疎水性相互作用媒体と結合するのを促進するに充分な高い塩濃度を与える。添加する塩の好ましい濃度は1、5Nである。添加される好ましい塩はNaClである。他の有用な塩は調整アンモニウムである。

[0033] 好ましい疎水性相互作用媒体は、大きなクロマトグラフィーに適し、共有結合したフェニル基を有する、ほぼ球形分子の調整アロースゲルで構成されている。このようなフェニルアロースは、“フェニルセファロースCL-4B”として市販されている (Pharacia-LKB, Inc., 米国、ニュージャージー州、ピスカタウェイ、カタログ番号: 17-0810-01)。

[0034] 水和フェニルアロースを、標準的方法を用いて適切なクロマトグラフィーのカラムに充填し、pHが約7.2-8.3好ましくは約7.5の高塩平衡化緩液で、約4-8℃にて平衡化する。好ましい高塩平衡化緩液は、有効量の、調整剤、重金属キレート剤、水溶性性界面活性剤、ならびに約1.5-2.0Mの塩度の塩を含有している。最も好ましい高塩平衡化緩液は、約10mMのトリス (pHは約7.5)、約1.5MのNaCl、約1mMのEDTA、約2mMのDTTおよび約20% (V/V) のグリセリンを含有している。

[0035] 塩で調整された可溶性抽出液の試料 (フェニルアロースの充填カラム容量1ml当たり約0.5-2.0mlの抽出液) を、平衡化されたフェニルアロースカラムに注入し、抽出液にタンパク質性物質が特に含有されるまで、カラムを平衡化緩液で洗浄する。緩液の紫外光を透過するならば、上記の試料は約280nmの波長の紫外光の吸光度を測定することによって決定される。一般に、フェニルアロースカラムを、約5-7倍カラム容量の平衡化緩液で洗浄する。PMTは、疎水性相互作用媒体に結合して脱着する。

[0036] フェニルアロースマトリックスに結合として脱着されているタンパク質 (PMTを含む) は、次に4-8℃にて、負荷緩液が (好ましくは約1.5M) から約0.0Mまで減少する線状塩配液を含有する。カラムの約4-6倍容量の平衡緩液を用いて洗浄し、次にカラムの2-3倍容量の追加の塩平衡化緩液で

(6)

特開平5-84075

10

液で洗浄する。好ましくは、溶剤緩液は、トリス (約10mM) (pHは約7.5)、DTT (約2mM) およびEDTA (約1mM) とグリセリン (約20% V/V) を含有している。

[0037] 約0.01-0.03倍カラム容量の成分を集め、以下のようにしてPMT活性を、280nmの波長の吸光度について検定した。一般に集められた抽出液は、約1-2倍のカラム容量と、約0.4-2.5mg/mlのタンパク質濃度をもっている。

[0038] 好ましいpH以外の塩も、前記の緩液に用いることができることは理解されるであろう。かような塩には、塩化カリウムおよび調整アンモニウムが含まれる。

[0039] この発明の精製方法の重要な工程は、下記のようにして実施される新調アニオン交換クロマトグラフィーの工程である。この工程を実施するには、カラムに添加されるタバコ植物抽出液 (例えば、好ましくはフェニルアロース抽出液) は、抽出液中のPMTがアニオン交換媒体に結合するようなpHと化学組成でなければならない。すなわち、抽出液は、pHが約7.2-8.3で、約0.0-1.0mM塩を含有していなければならない。好ましくはさらに以下のものを含む。約5-10mMの緩液、約1-10mMの還元剤、約10-30% (V/V) の水溶性界面活性剤、および約1-5mMの重金属キレート剤を含有すべきである。最も好ましくは、タバコ植物抽出液は、10mMのトリス/HCl (pH7.5)、2mMのDTT、1mMのEDTAおよび20% (V/V) のグリセリンを含有している。

[0040] 当該技術分野の熟練者には、勿論、タバコ植物抽出液のpHと塩濃度、と上記の数値が一変に変化させて、PMTが依然としてアニオン交換媒体と結合する負荷濃度になることができることは明らかである。特に、塩濃度を増加すると一般に、タンパク質のアニオン交換媒体に対する結合性が減少し、またpHを上昇させると、一般にタンパク質のアニオン交換媒体に対する結合性が增大する。それ故に当該技術分野の熟練者は、PMTがアニオン交換媒体と結合する、上記以外の塩濃度とpHの各値の組合せを容易に決定することができるであろう。可能なpH/塩濃度の組合せの唯一の例は、pHが、PMTを完全に不活性化するほどに高くないということである。一般に、PMTは、約8以上のpHに有意な酵素活性を呈すべきではない。

[0041] 上記のことから、アニオン交換媒体に添加されるタバコの抽出液が調整アンモニウムに由来されるか、または上記の疎水性相互作用クロマトグラフィーの工程からの抽出液の場合、その抽出液は、適当な緩液に脱塩しなければならないことは明らかである。この脱塩は標準的方法で達成される。例えば、ゲル浸透クロマトグラフィー (例えばセファックスG-25を用いる) または透析が、公知の方法を用いて利用できる。このよ

31

うな脱色は通析で行うのが好ましい。

【0042】好ましい方法では、前述の種々性質相互作用クロマトグラフィ工程から系末の抽出液（または他の高温タバコ抽出液）は、適切な抽出液もしくは抽出液1ml当たり約15～250mlの透析緩衝液に対して、約4～8℃にて約8～20時間、透析される。透析緩衝液は攪拌の方が好ましい。10000KDカットオフの透析膜が好ましい。透析緩衝液の化学組成とpHは、透析液成分中のPMTが、前記のようにアニオン交換媒体で保持されるように選択される。

【0043】アニオン交換媒体は、一つ以上の機能性のアニオン交換部分を有し、クロマトグラフィに適した大きな比表面積の粒子（例えば架橋されたアガロース）で構成されていなければならない。かようなアニオン交換部分は、ジエチルアミノエチル、ポリエチレンジアミン、第三級アミノ、第四級アミノ、 $\alpha$ -アミノベンジルおよびベンジル（2-ヒドロキシプロピル）アミノエチルからなる群から選択される。このような媒体は市販されている。ジエチルアミノエチル（“DEAE”）成分を持っているアニオン交換媒体が好ましい。DEAE-アガロース（“DEAE-Sepharose, Fast Flow”, Pharmacia-LKB, Inc., 米国、ニュージャージー州、ビスカウエー、カタログ番号: 17-0709-01）が最も好ましい。

【0044】アニオン交換媒体は、標準方法によって、平衡化緩衝液のpHと塩の状態で平衡化される。

【0045】平衡化されたアニオン交換媒体は、次いで、底部に、媒体を保持する手段（例えば半密封ガラスディスク）と出口管とを有するカラム（すなわち中置管）に標準的方法で充填する。次にカラムの頂部に水をし、入口管に接続する。次いで、好ましくは平衡化緩衝液をカラムに通過させ、通過液のpHと流速を監視して、媒体が完全に平衡化されていることを保証しなければならない。

【0046】カラムは、添加されるタバコ植物抽出液中のタンパク質が、すべて結合した場合、媒体の容量のわずかに約50%を占めるのに充分なアニオン交換媒体を含有していなければならない。例えば添加されるタバコ植物抽出液と上記の透析されたフェニルアガロース抽出液の場合、カラムには、透析されたフェニルアガロース抽出液1ml当たり約0.04～0.10ml（充填カラム容量）のDEAE-アガロースが入っていなければならない。

【0047】好ましくは、カラムに媒体を充填し、タバコ植物抽出液を添加するときと同じ温度で媒体を平衡化する。カラムが、タバコ植物抽出液を添加するときの温度より暖かい温度で洗浄もしくは溶離する場合、アニオン交換マトリックスを含有するスラリーは、カラムに充填する前に脱ガスを行う。

【0048】アニオン交換媒体に添加されるタバコ植物

(7)

特開平5-84075

32

抽出液について先に述べたように、アニオン交換媒体の平衡化緩衝液は、PMTが媒体によって保持されるようなpHと化学組成を有していなければならない。同様に、当該技術分野の熟練者は適切なpH/化学組成の組合せを容易に決定することができる。好ましい平衡化緩衝液には、特に塩は全く添加されておらずpHは約7.2～8.3であり最も好ましいのは7.5である。より好ましい平衡化緩衝液は、有効量の、緩衝剤、金属キレート剤、還元剤および水溶性性安定剤を含有している。最も好ましい平衡化緩衝液は、10mMのトリス/HCl (pH7.5)、1mMのEDTA、2mMのDTTおよび20% (V/V) のグリセリンを含有している。

【0049】タバコ植物抽出液、平衡化緩衝液およびアニオン交換媒体はすべて、平衡化、洗浄およびカラムの洗浄の前および実施中、温度が好ましくは約2～10℃であり、最も好ましくは約4～8℃である。

【0050】タバコ植物抽出液は、約0.1～0.3倍容積/分の流量で添加される。タバコ植物抽出液を添加して通過した液体は、事実上PMTを含有していないので脱離される。次にカラムは、タンパク質性物質の抽出が低レベルで安定化するまで平衡化緩衝液で洗浄する。その平衡化緩衝液が280nmで吸光する紫外線含有していない場合は、カラムを、280nm波長の紫外光の吸光度が低レベルで安定化するまで溶離緩衝液で洗浄する。一般に、アニオン交換媒体は、5～10倍容積の、10mM NaCl含有平衡化緩衝液で洗浄し、次いで別の3～10倍容積の、NaClなしの平衡化緩衝液で洗浄する。PMTは上記洗浄工程でアニオン交換媒体に保持されている。

【0051】洗浄後、PMTは、有効量のポリアミンを含有する溶離緩衝液で、アニオン交換媒体から溶離されるが、溶離液は、および溶離緩衝液のpHと化学組成は、ポリアミンがなければPMTがアニオン交換媒体に保持される条件である。

【0052】溶離緩衝液中のポリアミンは、ブトレン、N-メチルブトレン、スベルミン、スベルミジン、アダマチン、カゲバリンおよびその混合物からなる群から選択される。ブトレンが好ましいポリアミンである。ポリアミンは、溶離緩衝液中、約0.5～50mM、好ましくは1～10mM、最も好ましくは約5mMの濃度で存在していなければならない。

【0053】溶離緩衝液はさらに、有効量の、緩衝剤、金属キレート剤、還元剤および水溶性性安定剤を含有していることが好ましい。これらの成分は、抽出緩衝液について先に述べたものと同一である。有効量のこれらの成分は、当該技術分野の熟練者によって、余分の試験をせずに決定することができる。溶離緩衝液のpHは、約7.2～8.3、好ましくは約7.5でなければならない。アニオン交換媒体の平衡化緩衝液にポリアミンを補

50

(8)

特開平5-84073

13

充すると、適切な溶解液になる。適切な溶解液は、10 mMのトリス/HCl (pH 7.5)、1 mMのEDTA、2.0% (V/V) のグリセリン、2 mMのDTT、および5 mMのブトキシ(1, 4-ジアミノブタン) (Sigma Chemical Co., 米国、ミズー州、セントルイス、カタログ番号: P7505) を含有している。

【0054】アニオン交換カラムからのPMTの溶離は、約18〜20℃(すなわち室温)で行うのが好ましい。溶解液とアニオン交換カラムは、溶離が開始される前に、選択された溶離温度でなければならぬ。

【0055】PMTをカラムから溶離するには、溶解液を、約0.02〜0.10倍のカラム容積/分の速度で増加し、画分はカラムの底部から集める。また溶出液は単一の溶出液プールに集められる。最も好ましい溶離方法は、約1倍容積の溶解液がカラムに添加され、次に溶離を停止させる。アニオン交換媒体は、溶解液の1部と約1〜8時間、好ましくは約1時間接触したままにしておき、次の溶解液の添加を待たせる。

【0056】PMTはアニオン交換媒体から極めてゆっくりと溶出される。一般に、アニオン交換媒体は、約40〜70倍容積の溶解液で溶離され、最も好ましくは、少なくとも50倍容積の溶解液で溶離される。PMTの糖鎖が基を塩状するために、溶離された画分のPMT活性が下がるようにして検定される。

【0057】PMTは比較的希薄な状態で比較的大容量で回収されるので、アニオン交換溶出液を濃縮することが望ましい。その溶出液は、例えばアニオン交換媒体の溶解液の存在下、PMTに対して親和性を有するクロマトグラフィー媒体に添加され、そのクロマトグラフィー媒体から、結合物質を、良好な収率で比較的速速に形質で抽出することができ、あるいは、PMTは沈澱させてもよい。この発明の好ましい方法では、結晶化、アニオン交換カラムの出口は溶解カラムの入口に接続されている。このようにして、溶離されたPMTはアニオン交換カラムから溶出してから直接に溶解カラムに入り、そこで検定される。PMTのアニオン交換カラムからの溶離が完了した後、そのカラムの出口を溶解カラムからはずし、PMTを溶解カラムから溶離する。

【0058】好ましい溶解カラムは、ω-アミノヘキシルアクリレート ("ω-アミノヘキシルセファロース4B", Sigma Chemical Co., 米国、ミズー州、セントルイス、カタログ番号: A8804) ("AHS") を、アニオン交換カラムの10〜30%のカラム容積で溶離する。PMTは、比較的高い濃度の、好ましくは1.5 M NaCl を含有する溶解液で、このカラムから溶離される。溶解液は、好ましくは、さらに、有塩の、糖鎖、重金属キレート化剤、還元剤、および水溶性活性剤を含有している。最も好ましい溶解液は、

14

は、1.5 MのNaCl、1.0 Mのトリス/HCl (pH 7.5)、1 mMのEDTA、2.0% (V/V) のグリセリンおよび2 mMのDTTを含有している。溶解カラムは、4〜8℃で負荷され溶離されるのが好ましい。

【0059】溶解カラムからの最初の4〜8倍容積の溶出液が、PMTの活性の大部分を含有している。その画分は、好ましくは国外送装置 (Aricon Corp., 米国、マサチューセッツ州、ダンバースが市販している "セトリコン30") など、でさらに濃縮される。国外送を行った後、試料は一般に約0.04〜0.70 mg/mLのカラム容積をもっている。いくつものかような濃度カラムからの一般にPMTを含有している画分を集めてさらに濃縮する。

【0060】アニオン交換と試料濃縮の工程の後に得られたPMTはさらに分取規模の等電点法電気泳動法で精製される。等電点法は電気泳動法では、試料画分を、安定したpH勾配液の中に置き、次いでこの勾配液に電圧を印加する。各タンパク質は、そのたばくくの正味の電荷がそのpH勾配液の点にわたって電気泳動的に移動する。タンパク質の正味の電荷が等電点のpHは、そのタンパク質の等電点と等しい。

【0061】スクロース溶媒とポリアクリルアミドゲルを含む各々のpH勾配液安定化媒体を使用することができ、同時に、pH勾配液を分離して、等電点法電気泳動法の後タンパク質を回収する各種の方法を採用することができる。pH勾配液分離法は、勾配液安定化媒体と適合性であるように選択しなければならない。

【0062】好ましいpH勾配液安定化媒体は、ガラス管に入れたスクロース溶液 (密度勾配液) である。最も好ましくは、スクロース密度勾配液は、pHが約5〜約8の範囲にあるpH勾配液を含有している。好ましい勾配液分離法では、溶液を通じて液体の沈降が正確に制御される。集められた画分は、pHとPMT活性について試験される。等電点法電気泳動法の装置、化学薬品およびプロトコルはいくつもの商業的な企業から入手できる。

【0063】この発明の方法で単離されたPMTは他のタンパク質を実質的に含有せず。PMTは製剤中の支配的なタンパク質である。製剤中の少量の再タンパク質は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動法 ("SDS-PAGE") によって、標準の方法にしたがって分離される。このようにして、アミノ酸分析用に充分精製されたPMTが得られる。

【0064】PMTの特性決定  
タコPMTは、SDS-PAGEで測定した場合、約55〜65 kDaのタンパク質の分子量を有し、等電点法電気泳動法で測定した場合、pHが約5.0〜6.0の等電点の等電点を有することが特徴である。

【0065】さらに、タコPMTは、S-Aデノシル

50



15

メチオニンのメチル基をブトレッシンのS-アミノ基へ転移させる反応を促進する性能、およびブトレッシンに対する高い基質特異性を特徴としている。

【0066】メカリス・メンテン定数 ( $K_m$ ) は、初期の反応速度が、最大反応速度の  $1/2$  に等しくなるときの底質濃度として定義される。 $K_m$  値は、同じ反応を触媒する別個の酵素種に対しては広く変化する。したがって  $K_m$  の測定値は酵素に対して有用な「固定マーカー」である。精度に精製されたタバコPMTは、ブトレッシンについての  $K_m$  値が約  $0.0$  ~  $5.0 \mu M$  であることを特徴としている。この発明の精度に精製されたタバコPMTは、S-アデノシルメチオニンについての  $K_m$  値が約  $1.0$  ~  $15.0 \mu M$  であることを特徴としている。

#### 【0067】PMTの部分アミノ酸配列の決定

アミノ酸配列の分析の基盤として、標準のSDS-PAGE法を用いて、アミノ交換、試料の凍結および凍結点電圧化電気泳動法の工程の後に残留している少数の汚染タンパク質からPMTを分離する。SDS-PAGE法に基づいたの典型的なプロトコルは、Loomis, "Clonage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", Nature, 227巻, 580~585頁, 1970年, および電気泳動法装置のメーカーから提供されるマニュアルに見られる。公知の方法によって、個々のタンパク質を含有するバンドを、薄いシートもしくは膜に電気泳動的に転移させ（電気ブロットさせ）、それに保持させ視覚化する。公知の一つの方法では、タンパク質のバンドを、ポリウレタン（4-ヒニル-N-メチルピリジニウム）のような親水性ポリカチオンでコートされたガラス微小繊維のシートに電気ブロットさせ、次にフルオレシミンのような非アミノ性染料によって視覚化する。他の方法は、タンパク質を、ポリニッパヒニルジエーテルの上に（"Nimobilon-P", Millipore, 米国、マサチューセッツ州、ベッドフォード）、電気ブロットさせ、アミダグラーのようなアミノニオン染料で、バンドを視覚化する方法である（Bawer, "Alterations in the Phenotype of Plant Cells Studied by  $H_2$ -Terminal Amino Acid Sequences Analysis of Proteins Electrophoretically from Two-Dimensional Gel-Separated Total Extracts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84巻, 4808~4810頁, 1987年; A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Paul T. Matsuo, Academic Press, 米国, ニューヨーク, 1989年）。

【0068】単離されたタンパク質を、電気泳動ゲルから転移させ、転移させたタンパク質を視覚化する方法が好ましい。しかし、電気泳動法で単離されたタンパク質を配列分析用に準備するのに用いられる材料と方法の変化は、この発明から除外されないということとは、当

(5)

特開平5-84075

16

該技術分野の熟練者にとって明らかである。

【0069】バンドを構成する精製PMTは、見附けの分子重（すなわち約  $0.0$  KD）で同定される。タンパク質のバンドを電気泳動ゲルから膜に転移させ、転移させたバンドを視覚化した後、精製PMTの個々のバンドを有する膜片を、隣接するタンパク質のバンドによる汚染を避けて正確に切断。

【0070】タンパク質バンド（上記のようにして単離された）を構成する精製タバコPMTについて、標準の自動測定法によってアミノ酸配列を分析する。タバコPMTタンパク質は、配列番号1、配列番号2および配列番号3から選択されるアミノ酸配列を含有している。

【0071】配列番号1は、"a1" バンド（図6）からの配列であり配列番号2は "a2" バンド（図6）からの配列である。配列番号3は、配列番号1と配列番号2の共通配列である。

【0072】形成している精製タンパク質のバンドからの配列の相対的な相関性ことは、複合形のタバコPMTタンパク質が存在していることを示唆している。このような複合形のタバコPMTタンパク質は、単一の遺伝子産物の翻訳後の修飾から、または複合形PMTの遺伝子から生成する。

#### 【0073】PMT DNA配列のクローニング

この発明のPMTタンパク質の部分アミノ酸配列（配列番号1、配列番号2、配列番号3）は、次のようなオリゴヌクレオチドのセットを設計するのに用いられる。すなわちそのオリゴヌクレオチドの一つ以上が、タバコcDNAライブラリー中のPMT配列と選択的に相補を形成する。この選択的な相補形成は、PMTタンパク質の一部もしくは全体をコードする配列を含有するcDNAクローンを同定するのに用いられる。アミノ酸配列からのオリゴヌクレオチドプローブの設計についての説明は、Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 1989年の11章に記載されている。

【0074】かようなオリゴヌクレオチドプローブの合成は、市販の自動装置で日常実施されている。

【0075】cDNAライブラリーの構築は、現在、分子生物学の研究所では日常の作業である（Sambrook等の前記文献の5章参照）。同様に、対象の配列を含有するクローンを同定するために、オリゴヌクレオチドプローブによってcDNAライブラリーをスクリーニングすることは現在周知のことであり、当該技術分野の熟練者の能力内に充分含まれている。cDNAライブラリーをスクリーニングするのにオリゴヌクレオチドを使用することについての説明は、Sambrook等の前記文献の実験マニュアルの11章に記載されている。オリゴヌクレオチドプローブとの相補形成反応に基づいて選択されたcDNAクローンは、大きな、複製可能な存在およびヌクレオチド配列に特徴がある。このようなcDNA分析は

30

17

(10)

特開平5-64075

は、Sambrook等の前記文献、およびAusubel等、Short Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 米国、ニューヨーク、1989年に充分に記載されている。このようにして得られたいずれのPMT cDNAクローンも、それ自体、ほかのPMT cDNAクローンの同定に用いるプロトコルとして使用できる。

[0078] タバコ (ニコチアナ・タバタム L. var. (Nicotiana glauca L. var.) NK 328) のゲノムライブラリーは市販されている (Clontech Laboratories, Inc., 米国、カリフォルニア州パロ・アルト)。前記のゲノムライブラリーは、販売者が提供するプロトコルにしたがってスクリーニングされ、タバコPMTをコードする染色体遺伝子が得られる。

[0079] したがって、この発明はタバコPMTタンパク質をコードする組換えDNA分子を提供するものである。

[0078] PMT DNA配列で、センス配向もしくはアンチセンス配向に変化に形質転換されたトランスジェニックタバコ細胞とタバコ植物の製造

[0078] またこの発明は、タバコPMTタンパク質をコードしかつPMTアンチセンスRNA分子をコードし、作用可能な調節配列に連結された組換えDNA分子で安定に形質転換されたトランスジェニックタバコ細胞とタバコ植物を提供するものである。

[0080] 形質転換の対照のタバコ植物よりもニコチン含量が低いタバコ植物を製造するために、タバコ細胞と、部分PMT cDNA配列、全長PMT cDNA配列、部分PMT染色体配列、または全長PMT染色体配列を含有し、作用可能な連結された適切な調節配列には、転写開始配列 ("プロモーター") およびポリアデニル化/転写終結配列が含まれる。

[0081] トランスジェニックタバコ植物中のアンチセンス配列の発現には、一般にハナサライ・モザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーターを使用する (例えば、Comissien等、"Both RNA Level and Translation Efficiency are Reduced by Anti-Sense RNA in Transgenic Tobacco", Nucleic Acids Res., 17巻、833-843頁、1989年; Razafin等、"Anti-Sense RNAs of Cucumber Mosaic Virus in Transgenic Plants Assessed for Control of the Virus", Plant Molecular Biology, 11巻、463-471頁、1988年; Rodonnet等、"Nuclear-organellar Interactions: Nuclear Antisense Gene Inhibits Ribulose biphosphate Carbonicase Enzyme Levels in Transformed Tobacco Plants", Cell, 55巻、679-681頁、1988年; Smith等、"Antisense RNA Inhibition of Polygalacturonase Gene Expression in Transgenic Tomato

等、Nature, 334巻、724-728頁、1988年; Van der Krol等、"Anti-Sense Ouchone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation", Nature, 333巻、886-889頁、1988年を参照)。この発明の形質転換されたタバコの細胞と植物内で、PMTを発現するのCaMV 35Sプロモーターを用いることが好ましい。タバコの核の中で、他の組換え遺伝子を発現するためにCaMVプロモーターを用いることは充分に報告されている (Lau等、"Site-Specific Mutations Alter In Vitro Factor Binding and Change Promoter Expression Pattern in Transgenic Plants", Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86巻、7890-7894頁、1989年; Poulsen等、"Dissection of 5' Upstream Sequences for selective Expression of the Nicotiana plumbaginifolia rbc-8 B Gene", Mol. Gen. Genet., 214巻、16-23頁、1988年)。

[0082] CaMV 35Sプロモーターを使用する方法が好ましく、他のプロモーターがタバコ植物内に異種遺伝子を発現するのに成功しない限りこれは明らかであり、CaMV 35Sプロモーター以外のプロモーターを使用することもこの発明の範囲に含まれる。

[0083] 各種の転写終結配列が知られている。転写終結配列の組と同一性に基づいて便宜上の分類である。例えば、ノバリンセンター ("NOS")、オクトシンセンター ("OCS") およびCaMVポリアデニル化/転写終結配列は、トランスジェニックタバコ植物中で真接の遺伝子を発現させるのに用いられ、PMT配列の発現に有用である (例えば、Razin等の前記文献およびRodonnet等の前記文献を参照)。

[0084] 次に、制御地図の作成、サブユニット様複製技法、およびヌクレオチド配列分析のような標準技法を使用して、アンチセンス配向でPMT配列を有し、調節配列 (すなわちプロモーターと、ポリアデニル化/転写終結配列) に作用可能な連結されているターゲンを同定する。

[0085] 外置性DNAで安定に形質転換されたトランスジェニック細胞を製造するために、タバコ細胞のゲノムに外置性DNAを導入するのに適用できるよく発達した方法がある。多数の公知の、タバコ細胞形質転換法のいずれかを、この発明を実施するのに使用できる。タバコ細胞の形質転換法は、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 系の成分を用いるか否かに基づいて簡便に分類される。

[0086] アグロバクテリウム・ツメファシエンシス (Agrobacterium tumefaciens) は、"T-DNA" (転移するDNAとして) と呼ばれるヌクレオチド配列を有するプラスミドを有し、かつ天然の双子葉植物 (タバコを含む) の染色体に効率的に転移され、結晶され、感染した植物に直接に複製を形成させる能力を有する。

50

(11)

特開平5-84075

29

る。農種のDNAを植物の染色体に組み込むための天然産物のベクター系は、植物の遺伝子工学で、広く研究され、実用化され、開発されている (DeMaere等, "Efficient Tobacco Ti Plasmid-Derived Vectors for Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Plants", *Nucleic Acid Research*, 13巻, 4777~4789頁, 1985年)。農産物配列に対しセンス配向もしくはアンチセンス配向で作用可能な連結されたPMT DNA配列を含むような複製DNA分子を、適当なT-DNA配列に適合する方法によって複製する。これを、ポリエチレングリコール法または電穿孔法によって (両法とも標準的方法)、タバコの原生質体中に導入される。あるいはPMTをコードする複製DNA分子を含むようなベクターを、生アグロバクテリウム細胞に導入する。次いでこの細胞がそのDNAをタバコ植物細胞に転移させる (Koores等, "Gene Transfer in Plants: Production of Transformed Plants Using Ti Plasmid Vectors", *Methods in Enzymology*, 118巻, 827~840頁, 1986年)。

[0087] アグロバクテリウム法は当該技術分野では広く用いられているが、この発明の方法では必要要素ではない。T-DNAベクター配列をもっていない裸DNAによる形質転換は、タバコ原生質体DNA含有リポソームと融合させるかまたは電穿孔法によって行うことができる (Shillito等, "Direct Gene Transfer to Protoplasts of Dicotyledonous and Monocotyledonous Plants by a Number of Methods, Including Electroporation", *Methods in Enzymology*, 153巻, 313~316頁, 1987年)。T-DNAベクター配列をもっていない裸DNAも、不活性高速マイクロプロジェクティル (BIOLISTIC (登録商標) Particle Delivery System, Dupont, 米国、ダウケミカル、ウィルミントン) によって、タバコ細胞に形質転換するのに用いることができる。

[0088] この発明の形質転換されたタバコ細胞とタバコ植物を作製するのに使用されるPMT転換DNA分子とベクターは、さらに、優性の選択マーカー遺伝子を含む方が好ましい。タバコに用いるのに適切な優性の選択マーカーには、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼおよびグロブリンフェニルアセチルトランスフェラーゼをコードする抗生物質耐性遺伝子が含まれる。タバコに用いるのに適切な、その他の公知の優性の選択マーカーは、メトトレキレート耐性ジヒドロオキシレタクサゼをコードする炭水化物ジヒドロオキシレタクサゼ遺伝子である (DeMaere等の前記文献)。適切な抗生物質耐性遺伝子を含むようなDNAベクターおよび対応する抗生物質は市販されている。

[0089] 形質転換されたタバコ細胞は、選択された優性の選択マーカー遺伝子の産物が耐性を与える抗生

20

物質 (またはタバコ細胞に対して通常毒性の他の化合物) を適当な濃度で含有する培地に、細胞の混合集団を入れることによって、未形質転換細胞の周囲の細胞から選択される。したがって、形質転換されたタバコ細胞だけが生存し増殖する。

[0090] 形質転換された細胞は、当該技術分野で公知のタバコ細胞と組織の培養法を適用することによって、誘導されて、無傷で実りあるタバコ植物を再生する。植物再生方法は、形質転換法と整合するように選択される。特定のトランスジェニックタバコ植物のゲノム (genome) 中にPMT配列が安定に存在して配向していることの検証は、PMTの配列のメンデルの遺伝法によって行われ、制御された交雑によってもたらされる子孫に対して行われる標準のDNA分析によって明らかにされる。

[0091] トランスジェニックタバコ植物を、形質転換された細胞から再生させた後、導入されたPMT配列は、通常の植物増殖法で充分の実験なしで他のタバコ交雑に容易に転移される。

[0092] PMTアンチセンストランスジェニックタバコ植物の減少したレベルのニコチンは標準のニコチン検定法で検定される。

[0093] 上記の転換DNA法を知っていれば、金銭的PMT e DNA分子または金銭的PMT染色体遺伝子を用いて、適当な作用可能な連結された農産物配列をセンス配向で連結させて、トランスジェニックタバコ細胞とトランスジェニックタバコ植物を構築することができると分かる (また当該技術分野の熟練者は、センス配向で遺伝子を見出す適当な農産物配列が、上記のプロモーターとポリアデニル化/転写終止配列に加えて、公知の真核細胞開始配列のいずれか一つを含んでいることが分かるであろう)。このような形質転換されたタバコ植物は、PMTタンパク質のレベルが増大し、したがって未形質転換の対照のタバコ植物よりニコチン含有が高くなる特徴である。

[0094] それ故に、PMT DNA配列を用いて、PMTタンパク質のレベルを減少させるかまたは増加させて、タバコ植物中のニコチン含量を減少させるかまたは増加させることがこの発明の範囲に含まれることは理解すべきである。

[0095] この発明を一層よく理解するために以下に実施例を示す。これらの実施例は示すことだけを目的とするもので、この発明の範囲を限定するものではない。

#### [0096] 実施例

##### 農産物遺伝子の組成

##### 標準DNA

50 mMのトリス/HCl, pH7.5

5 mMのEDTA (逆離液)

20% (V/V) のグリセリン

50

21

(12)

特開平5-84075

22

2 mM DTT

0.5% (W/V) のアスコルビン酸ナトリウム

2% (W/V) のPEG 400

0.4 mg/ml のPMSF (1 mg/ml の貯蔵液由来)

0.4 mg/ml のロイペプチン (1 mg/ml の貯蔵液由来)

100 g/ml のPVPP

40 g/ml のアンバーライトXAD-4

緩衝液B

10 mM のトリス/HCl, pH 7.5

1 mM のEDTA (遊離酸)

20% (V/V) のグリセリン

2 mM DTT

0.4 mg/ml のPMSF (1 mg/ml の貯蔵液由来)

0.4 mg/ml のロイペプチン (1 mg/ml の貯蔵液由来)

緩衝液C

10 mM のトリス/HCl, pH 7.5

1 mM のEDTA (遊離酸)

20% (V/V) のグリセリン

2 mM DTT

[0097] グロブリン製剤の貯蔵液

PMSF (1 mg/ml) をジメチルホルムアミドに溶解し、2.1 ml ずつ、使用するまで-20℃で貯蔵した。ロイペプチン (1 mg/ml) を蒸留水に溶解し、2.1 ml ずつ、使用するまで-20℃で貯蔵した。

[0098] 粗製抽出液の製造

水懸液法で精製したタバコ (ニコチアナ・タバム L. var. バレイ21) 植物の約1 Kgを、薄花してから3日後に収穫した。収穫した根は湯水で洗浄し、フラスコに入れて水を吸引して除去した。洗浄した根を-80℃に冷却して貯蔵した。冷凍した根を、1 g/コンクリートブレンダー中で予め冷却したスライサーに投入した。2.5 lの緩衝液に添加した。根を大きなスプーンで最速スライサーと混合した。ブレンダーを低速設定で運転を開始し、次に中速設定でホモゲナイゼーションを行った。ホモゲナイゼーションの速度が3~5℃より高くならないように注意した。

[0099] 得られた抽出物を遠心分離びんに入れ、13800×gで70分間4℃で遠心分離して不溶性の破片をペレット化した。

[0100] 上清液をデカントした。その容積は2.37 lであった。約0.77 gのDTTを抽出液に添加した。

[0101] 精製アンモニウムによる分離

精製アンモニウムの塩基を、抽出液100 ml 当り2.8 gの量で抽出液に徐々添加し、精製アンモニウ

ムで抽出液を40%飽和度にした。得られた精製アンモニウム含有抽出液を4℃で2時間保持した。

[0102] 40%飽和度の精製アンモニウムによる沈殿を、27500×gで30分間4℃にて遠心分離することによって取出した。抽出液1 l 当り0.33 gの追加のDTTを添加した。精製アンモニウムの結晶を、抽出液100 ml 当り15.3 gの量で抽出液に徐々添加して、精製アンモニウムの濃度を40%飽和度から65%飽和度まで増大させた。65%飽和度の精製アンモニウム含有の抽出液を一係4℃で保持した。40~65%飽和度の精製アンモニウムによる固分を、27500×gで70分間4℃にて遠心分離することによってペレット化し、上清液を廃棄した。

[0103] 40~65%飽和度の精製アンモニウムによる沈殿を緩衝液Bに溶解して全容積を200 mlにKし、次に17.53 gのNaClを添加し、水上で固分を溶解させた。NaClを添加した40~65%飽和度の固分を47800×gで30分間、4℃で遠心分離し、生成したペレットを廃棄した。

[0104] 粗製抽出液の製造と精製アンモニウムによる固分を、先に述べたのと実質的に同じようにしてさらに3回実施し、得られた四つの40~65%飽和度精製アンモニウム固分 (各々200 ml) をプールした。このようにして製造した800 mlのプールの合計5.239 Kgの根の粗重量に相当するものであった。

[0105] 疎水性相互作用クロマトグラフィー

フェニルセファロースCL4B (Pharmacia Inc., 米国、ニュージャージー州、ヒスカウエイ、カタログ番号: 17-0810-01) 疎水性相互作用カラム (5 cm × 20 cm) を、1.5 M NaCl を補充した緩衝液Cで平衡化した。5.239 Kgの根の粗重量に相当する、800 mlのプールの濃度を40~65%飽和度精製アンモニウム固分を、上記の平衡化したフェニルセファロースカラムに注入した。280 nm波長の吸光度の測定したベースラインが得られるまで (未結合のタンパク質がすべて除去されたことを示す)、カラムを、1.5 M NaCl を補充した緩衝液Cで洗浄した。次に、緩衝液C中1.5 Mから0.0 Mまで濃度が低下するNaClの線状勾配液2 lでPMTを洗脱した。洗脱の緩衝液C1) でさらにカラムを洗浄した。各々12 ml ずつの固分を収集し、固分を (PMT活性がピーク毎々よりその前後では3面分毎に、その他の4面分の固分では10面分毎に)、つぎのようにしてPMT活性を連続して検定した。疎水性相互作用クロマトグラフィーを、4℃にて

4.7 ml/minの流速で実施した。

[0106] PMT活性を有するフェニルセファロース固分#8B~#11Sをプールし、得られたプールを絶えず保持しながら、8 lの緩衝液Cに対して約18時間透析した。透析された試料を100 ml ずつの四つの部分に分けて-80℃に冷却した。

50

23

(13)

特開平5-84075

24

(0107)

## PMT活性の検定

各反応管に以下のものを入れた。

- 12.5nmol トリス/HCl 8.3
- 0.25nmol EDTA
- 1.25nmol 2-メルカプトエタノール
- 0.8nmol ブトレッシン
- 0.15nmol 未標識S-アデノシルメチオニン
- 0.18nmol [<sup>14</sup>C-メチル]S-アデノシルメチオニン (57nCi/nmol)

酵素試料

合計容積=0.25ml

[0108] 反応は酵素試料を添加することによって開始され、30℃にて30分間行なった。NaClで飽和した10% (W/V) NaOH溶液0.5mlを添加することによって反応を停止させた。

[0109] 放射活性生成物、N-(<sup>14</sup>C-メチル)ブトレッシン、クロロホルムへの溶解抽出によって、酵素から分離した。反応を停止させた混合物を1mlのクロロホルムとともに90秒間振盪保持した後、1800×gで5分間遠心分離して有機相と水相に分離させた。次に、有機相の0.5mlを検定した。0.5mlの有機相を、0.5mlの液体シンチレーションカクテル (Beckman Instruments, 米国、メリーランド州、コロニア) に添加し、放射能を液体シンチレーションカウンタを用いた標準の方法で測定した。

[0110] PMT活性の1単位は、30℃にて30分間に生成する生成物の1ナノモルと定義する。

[0111] 魚の別種がすべての検定に含まれている。魚の別種は、酵素なしの反応混合物、または時間零の時点でNaOHで反応を停止させた混合物で構成されている。

[0112] アニオン交換クロマトグラフィー、フェニルセファロースで精製した100mlずつの二つの試料を溶解し、次いで、4℃にて脱脂液Cで平衡化したDEAE-セファロース "Fast Flow" カラム (Pharmacia-LKB, 米国、ニュージャージー州、ビスカウエイ、カタログ番号: 17-0709-01、ロット番号: OB-06854、1cm×14.5cm) K、4℃にて、1.5ml/minの流速で注入した。

[0113] 次にDEAE-セファロースカラムを、安定した280nmのベースラインが得られるまで、10ml NaCl を含有する緩衝液C70mlを用い、1.5ml/minの流速で洗浄した。次にこのカラムを、NaClなしの緩衝液Cの50mlで再び平衡化した。次にカラムの流速を室温 (24℃) まで上昇させ、カラムの空層容積を、5mMブトレッシン (Sigma Chemical Co., 米国、ミズリー州、セントルイス、カタログ番号: P7505、ロット番号: 89F0039) を含有緩衝液Cで洗脱した。カラムを24℃で約1時間、何も流過させず

に保持し、次いで5mMブトレッシン含有緩衝液C892mlを用いて0.7ml/min (15時間) の流速で24℃にてPMTを洗脱した。

[0114] 標準によるPMTの検定  
DEAE-セファロースカラムから洗出させたPMTを、60-アミノヘキシルセファロース4B ("AH S") (Sigma Chemical Co., 米国、ミズリー州、セントルイス、カタログ番号: A8884) のカラム (1cm×3cm) (4℃に保持した) に直接装填した。PMTを、上記AH Sカラムから、1.5M NaClを含有する緩衝液Cを用いて1.5ml/minの流速で洗脱した。12~15mlずつの四つの画分を収集し、上記のようにしてPMT活性を決定した。最初の画分 (14.7ml) が、AH S緩衝液カラムから回収された全PMT活性の80%以上を含有していた。

## [0115] 図表通達

さらに精製するために、13.7mlの最初のAH S画分を六つの画分に分割して、"Centricron 30" (Amicon, 米国、マサチューセッツ州、ダンバーズ) 膜外濾過装置に入れて約25倍に濃縮した。6台の上記装置からの濃縮液をプールし、塩を添加していない緩衝液Cで約80倍に希釈し、単一の "Centricron 30" を用いて、全容積が約150μlになるまで2段階の膜外濾過を行った。得られた150μlの濃縮液を-80℃で貯蔵した。

## [0116] 分離電気泳動電気泳動法

DEAE/AHS工程 (膜外濾過法による濃縮を含む) で精製したPMTを、等電点電気泳動法にさらに精製した。分離規模の等電点電気泳動法を、スクラム濃度40mM中 (1.8cm×21cm) で市販の両性電解質 (Pharmacia-LKB, 米国、ニュージャージー州、ビスカウエイ) を使って実施した。pHの範囲は両性電解質の形成物の範囲書にしたがって作製し、pHの範囲を約8.3~約8.8とした。1000~4000ボルトの電圧を印加して (1~4ワットの電力)、約3時間電気泳動を行った。電気泳動を行った後、1mlずつの画分を採取、各画分のpHとPMTの活性を測定す

50

25

(C4)

特開平5-84075

た。熔点化と溶分の収率は4℃で行った。

【0117】図4は、等電点偏光化電気泳動を行った後の、PMT相対活性とpH対面分番号（すなわちスクロース密度勾配の位置）の対照グラフである。図4に示す実験データは、タバコPMTの等電点が約5.7であることを示している。他の等電点偏光化電気泳動の実験では、タバコPMTのPIは、5.0という低い値と5.8という高い値を示すようである。実際には、多くの因子が足掛けのPIに影響して、PIの測定値は適宜いく\*

表

工程の段階	全タンパク質 (mg)	比 活 性 (単位/mg)	活性収率 (%)	精製度 (倍)
粗液アンモニウム	4218	47.9	100.0	1.0
フェニルセファロース	660	234.6	46.3	2.8
DEAE/AHS	1.76*	5203	7.7*	108.6

\* 四つの別個の粗製抽出液由来の40~65%飽和度硫酸アンモニウムによる溶分のプール。

\*\* フェニルセファロースカラム由来の物質の1/2だけを示す。

【0120】また、この発明の方法の連続した段階におけるPMTの相対純度を、標準のSDS-PAGE法で測定した。図1は、PMT精製工程の各段階において試料が（細線色時）示すSDS-PAGEタンパク質バンドパターンを示す。ゲル上の材料は次のとおりである。レーン1と8：分子重量標準タンパク質（後記の図面の簡単な説明の欄に列挙した）；レーン2：40~65%飽和度硫酸アンモニウムによる溶分；レーン3：フェニルセファロースカラム由来のPMT活性がピークの溶分；レーン4：DEAE/AHS段階由来の精製物質；レーン5：DEAE/AHS段階由来の精製物質を等電点偏光化電気泳動させたものPMT活性がピークの溶分。DEAE/AHSで精製された物質（レーン4）で実証的なPMTバンド（矢印で示す）が、胃出の融水性相互作用の脂由来の物質（レーン3）中にはほとんど観察できないことが分る。

【0121】タバコPMTの分子量

タバコPMTの見掛けの分子量を、硫酸アンモニウム、フェニルセファロース、およびDEAE-AHS/膜外濾過の精製段階を通過したPMT物質を注入した非変性の電気泳動ゲル上でPMTを単離した実験で測定した。非変性濃縮ゲルの緩衝液は、0.27Mトリス/HCl (pH 6.8)、1.0%(V/V)グリセリンおよび2.0mMの2-メルカプトエタノールを含有していた。非変性12.5%ポリアクリアミド分離用ゲル濃度は20.88Mトリス/HCl (pH 8.8)、1.0%(V/V)グリセリン、および12mMの2-メルカプトエタノールを含有していた。

26

\* らみ実験することは、当該技術分野の熟練者なら分かるであろう。

【0118】精製工程の連続した段階におけるPMTの相対純度を比活性の測定値で評価した（表1）。表1に示す精製度値（倍）は、タバコの粗製抽出液からの実際の精製度の過小評価値である。なぜなら40~65%飽和度硫酸アンモニウムによる溶分、活性収率を計算するに100%としているからである。

【0119】

1

【0122】非変性ゲル由来の単一のレーンを切り取り、長さ方向に1/2に切断し、次いで3mm厚のスライスに切断した。各ゲルスライスの1/2を、標準のPMT検定混合物に添加入れ、各ゲルスライスの測定する1/2をSDS-PAGEに付した。

【0123】最高のPMT活性を示した非変性ゲルスライス（図2）は、特に、見掛けの分子量が約80KDの単一タンパク質を含有していた（図3）。

【0124】PMTの酵素活性

酵素活性試験を、この発明の高度に精製したタバコPMTについて行った。1,3-ジアミノプロパンと1,5-ジアミノペンタン（いずれもブトレシンの化学的類似体）、ホスファチジルエタノールアミン（メチル基受容体）およびN-メチルブトレシン（PMTの通常の底物）をPMTに対する基質として加えて比較して、ブトレシン（1,4-ジアミノプロパン）と比較した。1,3-ジアミノプロパン、1,5-ジアミノペンタンおよびホスファチジルエタノールアミンを、標準のPMT検定法（上記の検定法）でブトレシンの代わりに用いた場合、検出可能な量の放射性産物生成は生成しなかった。PMTの検定に、N-メチルブトレシンをブトレシンの代わりに用いた場合、放射性産物の生成は、ブトレシンで検定したときの8%以下であった。

【0125】二つのPMTの基質、すなわちブトレシンとS-アデノシルメチオニンの基質のKm値を他の基質と選択的に存在させながら、一つの基質の各濃度の濃度で（上記のようにして）PMT活性を測定することによって決定した。精度に精製したタバコPMTのブトレシンについてのKmは約400μMであった。高精度に精製したタバコPMTのS-アデノシルメチオニンについてのKmは約125μMであった。精度に精製されたタバコPMTによってブトレシンについて測定され

27

(15)

特開平5-84075

28

たK<sub>m</sub>値と、高度に精製されたタバコPMTによってS-アデニルメチオニンについて見出されたK<sub>m</sub>値は、PMTについて発見された値とよく一致している (Mitsunaka等の特許文献: Feth等, "Determination of Putrescine N-methyltransferase By High Performance Liquid Chromatography", Phytochemistry, 24巻, 92, 1-923頁, 1985年)。

【0128】アミノ末端アミノ酸配列の分析

配列分析用のタバコPMTは、試薬アンモニウムによる分離、フェニルセファロースクロマトグラフィー、ブトレーションで溶解するDEAEセファロースクロマトグラフィー (次いでAHSと脱炭酸法で脱炭酸を行う)、およびフリーフロー等電点結晶化電圧移動法の精製工程にかけた物質を、SDS-PAGE法に付することによって単離した。高度に精製したPMTをSDS-PAGEに付した後、得られたタンパク質のバンドをボリニフ化ヒニリデンの膜 ("Immobilon", Millipore, 米国、マサチューセッツ州、ベッドフォード) 上にエレクトロブロットを行い、次いでアミドブラックを用い、標準方法で染色した。"a1" バンド (図3参照) を有する膜片は、タバコPMTの分子質量特性を示す高度に精製された製剤の二つだけのバンド (図3参照) の一つであるが、これを、隣接する "a2" バンドをさけて切取った。このようにして単離したPMTについて、メーカーが推薦する方法にしたがって、オンライン1200A分析計 (ハルス液相シークエンサー) を備えたApplied Biosystems 477A型を用いてアミノ末端アミノ酸配列分析を行った。

【0127】タバコPMTの "a1" バンドのアミノ末端における最初の17のアミノ酸の配列は、(配列番号 30) 1): Leu Ser Xaa Asn Phe Leu Phe Gly Thr

(41) 配列:

Leu Ser Xaa Asn Phe Leu Phe Gly Thr  
1 5  
Ala Ser Ser Xaa Tyr Gln Tyr Glu  
10 15

(2) 配列番号: 2

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 17アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

(41) 配列:

Leu Ser Ser Asn Phe Leu Phe Gly Thr  
1 6  
Ala Ala Pro Tyr Tyr Gln Tyr Glu  
10 15

(3) 配列番号: 3

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 17アミノ酸

\* Phe Gly Thr Ala Ser Ser X  
aa Tyr Gln  
Tyr Gluであることが分かった。

【0128】"a2" バンド (図5参照) は、タバコPMTの分子質量を示す二つだけのバンドの2番目のものであった (図3参照) 。"a2" バンド (図5) を作り "a1" バンドと同様にして分析したところ、"a2" バンドは、以下の部分アミノ酸配列 (配列番号2): Leu Ser Ser Asn Phe Leu Phe Gly Thr Ala Ala Pro Tyr Tyr Gln Tyr Gluを生成した。

【0129】この発明のいくつかの態様を説明してきたが、基本的な構造を覚えてこの発明の方法と生成物を利用する他の態様を提供することができることは明らかである。それ故に、この発明の範囲は、実施例として示した特定の態様ではなく特許請求の範囲によって定義されるべきであることが分かる。

【0130】配列表

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 17アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

(111) ハイポセチカル: N

(111) フラグメント型: N末端フラグメント

(111) 起源:

(A) 生物名: ニコチアナ・タバタム

(B) 株名: バレーイ21

(C) 組織の種類: 根

(111) ハイポセチカル: N

(111) フラグメント型: N末端フラグメント

(111) 起源:

(A) 生物名: ニコチアナ・タバタム

(B) 株名: バレーイ21

(C) 組織の種類: 根

(111) 配列の種類: タンパク質

(111) 配列:

Leu Ser Ser Asn Phe Leu Phe Gly Thr  
1 6  
Ala Ala Pro Tyr Tyr Gln Tyr Glu  
10 15

(3) 配列番号: 3

(1) 配列の特性:

(A) 長さ: 17アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) トポロジー: 直鎖状

(11) 配列の種類: タンパク質

(iii) ハイボセティカル: N

(iv) フラグメント型: N末端フラグメント

(v) 経路:

(xi) 配列:

Leu Ser Xaa Asn Phe Leu Phe Gly Thr

Ala Xaa Xaa Xaa Tyr Gln Tyr Glu

(xii)

特開平5-84075

\* (A) 生物名: ニコチアナ・タバカム

(B) 株名: バレー21

\* (C) 組織の種類: 根

【面の簡単な説明】

【図1】図1は、タバコPMTの精製工程の連続段階で得られたタンパク質のパターンを示す。銀染色12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルの写真の複写物である。レーン1と6: 分子重量標準タンパク質 (ホスホリラーゼB, 95.5 KDa; グルタミン酸デヒドロゲナーゼ, 55.0 KDa; オボアルブミン, 43.0 KDa; 乳酸デヒドロゲナーゼ, 36.0 KDa; カルボニックアンヒドラーゼ, 29.0 KDa; ラクトグロブリン, 18.4 KDa; シトクロムC, 12.4 KDa)。レーン2: 40~65% 飽和硫酸アンモニウム画分。レーン3: 疎水性相互作用カラム由来のPMT活性ピーク画分。レーン4: アニオン交換カラムからブトレンで溶離して濃縮した物質。レーン5: アニオン交換カラム由来の塩阻物質のフリーフロー等電点電気泳動によって得られたPMT活性ピーク画分。

【図2】図2は、12.5%非変性ポリアクリルアミドゲル由来の3 mm厚連続スライスのPMT活性を示すグラフであり、そのゲルには、アニオン交換カラムからブトレンで溶離して濃縮した物質をロードした。PMTの酵素活性は、生成物として回収された<sup>14</sup>C-煙草ニコチン/分 (バックグラウンド上) として表現し、「相対活性」と命名してある。

【図3】図3は、非変性電気泳動ゲルのPMT活性のパターンおよびその前後の3 mm厚連続スライス (図2) が純度と見掛けの分子量について分析された。銀染色12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルの写真の複写物

である。「Sm」と命名されているレーンは出発物質 (すなわち非変性ゲルに添加された物質) を含有している。「S1d」と命名したレーンは、分子量標準タンパク質 (ホスホリラーゼB, 95.5 KDa; グルタミン酸デヒドロゲナーゼ, 55.0 KDa; オボアルブミン, 43.0 KDa; 乳酸デヒドロゲナーゼ, 36.0 KDa; カルボニックアンヒドラーゼ, 29.0 KDa; ラクトグロブリン, 18.4 KDa; シトクロムC, 12.4 KDa) を含有している。

【図4】図4は、硫酸アンモニウム画分法、疎水性相互作用クロマトグラフ、およびアニオン交換カラムからのブトレンによる溶離に続いて試料を濃縮することによって精製したタバコPMTを等電点電気泳動泳動させることによって得られた画分の相対PMT活性とpHを画くグラフである。PMTの酵素活性は、生成物として回収された<sup>14</sup>C-煙草ニコチン/分 (バックグラウンド上) として表現し、「相対活性」と命名してある。

【図5】図5は、(不活性) にエレクトロブロットした後) 切り取り、アミノ酸配列の決定を行ったPMTタンパク質バンド (「a1」と「a2」) を示す銀染色12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルの写真の複写物である。ゲルにロードした試料は、アニオン交換カラムからブトレンで溶離された物質を等電点電気泳動泳動させて得た画分の一部である。配列分析に用いられた実際のバンドは、図5のゲルで分析されたのと同じ物質の一部をロードした別図の (しかし同じ) ポリアクリルアミドゲル由来のものである。

【図3】

FIG. 3



【図5】

FIG. 5





(17)

特開平5-84075

〔図1〕

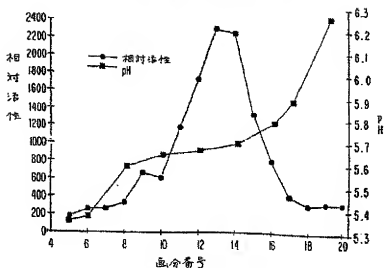
FIG. 1



〔図4〕

FIG. 4

PMT=基電圧基準化電気泳動

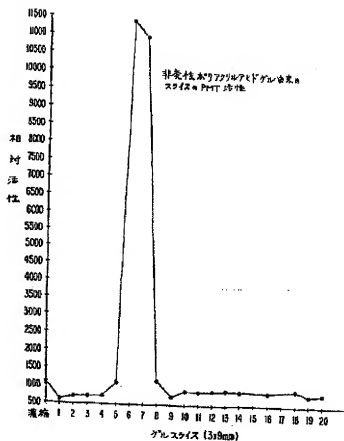


(18)

特開平5-84075

[図2]

FIG. 2



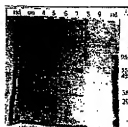
【手続補正書】  
 【提出日】平成3年12月6日  
 【手続補正1】  
 【補正対象書類名】図面  
 【補正対象項目名】図1  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図1】

FIG. 1



【手段補正2】  
 【補正対象項名】図面  
 【補正対象項目名】図3  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図3】

FIG. 3



(29)

特開平5-84075

\*【手段補正3】  
 【補正対象項名】図面  
 【補正対象項目名】図5  
 【補正方法】変更  
 【補正内容】  
 【図5】

FIG. 5



## フロントページの続き

(51)Int. Cl.

C 12 N 5/10

15/11

15/24

//C 12 N 9/20

C 12 R 1:50

特許庁長官

F 1

特許表示箇所

(72)発明者 ユエドバル・ス・ソリク  
 アメリカ合衆国ヴァージニア州43256、リ  
 フチモンF、タイーベリ、ドライヴ  
 2714